

## ⑫ 公表特許公報 (A)

平3-503317

⑬ 公表 平成3年(1991)7月25日

⑭ Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	厅内整理番号	審査請求 未請求
G 01 N 27/62	X	7529-2G	予備審査請求 未請求
30/72	G	7621-2G	部門(区分) 6 (1)
H 01 J 49/26		7247-5C	

(全7頁)

⑮ 発明の名称 凍結溶液からの脱着による質量分析用試料の調製方法

⑯ 特願 平2-503086

⑰ 出願 平2(1990)1月12日

⑯ 脳訳文提出日 平2(1990)9月13日

⑯ 国際出願 PCT/US90/00229

⑯ 國際公開番号 WO90/08398

⑯ 國際公開日 平2(1990)7月26日

⑭ 優先権主張	⑮ 1989年1月17日⑯ 米国(US)⑰ 298,649	
⑭ 発明者	ペッカー、クリストファー・エイチ	アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025 メンロ・パーク、クローバー・レーン 106
⑭ 出願人	エス・アール・アイ・インター・ナショナル	アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025-3493、メンロ・パーク、レイヴンズウッド・アヴェニウ 333
⑭ 代理人	弁理士 川原田 一穂	
⑭ 指定国	A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)	

## 請求の範囲

1. 次記の各工程を含むことを特徴とする質量分析用不揮発性分子試料の調製に有用な方法;
  - (a) 溶液を形成するように溶媒中に溶解させて、分析すべき1以上の型の分子を含む溶液を与える工程、
  - (b) 溶解した分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結する工程、および
  - (c) 該凍結溶液を、分析すべき分子を該凍結溶液の表面から脱着させるエネルギー源に暴露する工程。
2. 分析すべき1以上の分子を溶解して含む該溶液を与える該工程が、さらに、少なくとも約500amuの質量を有する1以上の型の分子を溶解した溶液を与えることを含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。
3. さらに、脱着した分子を質量分析領域に運ぶ工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。
4. 分析すべき1以上の分子を含む溶液を与える該工程が、さらに、該分子を、該大きな分子を脱着するのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒に溶解させる工程を含み、該溶媒が、該分子の、該凍結溶液の表面からの脱着を、該エネルギーの凍結溶液の表面より下での実質的吸収がなく、そのため溶液全体の加熱を阻止するように許容するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。
5. 分析すべき該分子を溶媒に溶解させる該工程が、該分子の低分子量溶媒中への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第4項記載の方法。
6. 分析すべき該分子を低分子量溶媒に溶解させる該工程が、さらに該分子の約100amuより小さい原子量を有する溶媒分子

より本質的になる溶媒中への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

7. 分析すべき該分子を低分子量溶媒に溶解させる該工程が、さらに該分子を、水、1-5炭素原子の有機溶媒およびその混合物よりなる群から選ばれた溶媒への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

8. 溶解した分子の該溶液を凍結させる該工程が、さらに、10<sup>-3</sup>トルを越えない蒸気圧を有する凍結溶被を形成させることを含むものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

9. さらに、分析すべき該分子の該凍結溶液を真空室に運び、該凍結溶液を、該分子を該凍結溶液の表面から脱着させる間、10<sup>-3</sup>トルを越えない圧力を維持する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

10. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、レーザ放射に暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

11. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、イオン・ビーム・ポンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

12. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、電子ビーム・ポンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

13. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させる

## 特表平3-503317(2)

エネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、高速原子ビーム・ポンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

14. 該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、さらに該脱着した分子を、イオン化エネルギー源に暴露して、該脱着した分子を、該イオン化分子の質量分析の準備のためイオン化させる工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

15. 次記工程を含むことを特徴とする、質量分析のための大分子の処理に有用な方法：

- (a) 少なくとも約 500amu の分子量を有する1以上の分析すべき分子を、統いて該分子を溶液から脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収することのできる低分子量溶媒に溶解させた溶液を与える工程、
- (b) 溶解分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結させる工程、
- (c) 該凍結溶液を、 $10^{-3}$ トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する工程、および
- (d) 該真空室内で、該凍結溶液を、該凍結溶液の表面から分析すべき分子を 1-100 分子層脱着させるのに充分なエネルギー源に暴露する工程。

16. 該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、かような脱着分子のイオン化を結果しないものであり、且つ該方法が、該脱着分子を、イオン化分子の質量分析の準備のため該脱着分子をイオン化するイオン化エネルギー源に暴露する工程をも含むものであることを特徴とする請求の範囲第15項記載の方法。

强度を有するイオン化源に暴露する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

22. 該凍結溶液を、 $10^{-3}$ トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する該工程が、さらに、先ず該凍結溶液を該温度まで冷却し、次いで該冷却した凍結溶液を該真空室内に導入する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

23. 該凍結溶液を、 $10^{-3}$ トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する該工程が、さらに、先ず該冷却した凍結溶液を該真空室内に導入し、次いで該凍結溶液を該温度まで冷却する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

17. 該脱着分子をイオン化源に暴露して該脱着分子をイオン化する該工程が、さらに該脱着分子を光イオン化源に暴露する工程をも含むものであることを特徴とする請求の範囲第16項記載の方法。

18. 該分子を脱着させ、該脱着分子をイオン化する該工程が、繰り返しサイクルで遂行されることを特徴とする請求の範囲第16項記載の方法。

19. 該繰り返し脱着およびイオン工程が、該脱着エネルギー源および該イオン化源を繰り返しパルス駆動することにより遂行されることを特徴とする請求の範囲第18項記載の方法。

20. 次記工程を含むことを特徴とする、質量分析のための大分子の処理に有用な方法：

- (a) 少なくとも約 500amu の分子量を有する1以上の分析すべき分子を、低分子量溶媒に溶解させて溶液とし、該溶液を与える工程、ここで該溶媒は、統いて該分子を該溶液から脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収することのできるものである、
- (b) 溶解分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結する工程、
- (c) 該凍結溶液を、 $10^{-3}$ トルを越えない蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する工程、および
- (d) 該真空室内で、該凍結溶液を、該凍結溶液の表面から分析すべき分子を 1-100 分子層脱着させるのに充分なレーザ放射、イオンビーム・ポンバードメント、電子ビーム・ポンバードメントおよび高速原子ポンバードメントによる群から選ばれたエネルギー源に暴露する工程。

21. さらに、該脱着分子を、該脱着分子のイオン化に充分な

### 明細書

#### 凍結溶液からの脱着による質量分析用試料の調製方法

##### 発明の背景

##### 1. 発明の分野

本発明は、質量分析用試料の調製方法に係る。さらに特徴的に言えば、本発明は、質量分析のための不揮発性または不安定な大きな分子の試料の調製方法を指向しており、そこでは、先ず大きな分子の溶液を凍結させ、凍結した分子を脱着させ、そして若し脱着分子が脱着手段によって既にイオン化していない場合には、イオン化分子の質量分析ゾーンへの導入に先立つて脱着分子をイオン化するものである。この方法は、液体クロマトグラフィーと機械的にインタフェースすることが可能かつ容易である。

##### 2. 先行技術の記載

液体クロマトグラフィー技術と組合せられた分子の質量分析において、液体は、しばしば蒸発し、蒸気中の分子は、質量分析用機器への導入に先立つてイオン化され、あるいは、溶液を蒸発させて得られた分子は、質量分析用機器のための粒子あるいは光量子を脱着することによりイオン化される。しかしながら、分析用の大きな不揮発性または熱的に不安定な分子試料の調製のため慣用されている気化あるいは脱着技術は、溶媒和分子の不出来な気化あるいは脱着のみならず、かような大きな分子の制御不能な分裂あるいはクラスターリング（集合）を招くことがある。（不信頼性）

マクラッファティーら (McLafferty et al) に与えられた米国特許第 3,937,298 号は、液体クロマトグラフィー／質量分析装置を開示しているが、それは、カラムから溶離した流出液

### 特表平3-503317(3)

の部分（单／複数）を、充分な真空ポンピングによって、化学イオン化質量分析計のイオン化室に直接導入するものである。

ブルーニーら (Brunee et al) に与えられた米国特許第 4,259,572 号は、質量分析用イオン化試料の調製方法を開示しているが、それは、液体クロマトグラフィー・カラムからの流出液を、動いているベルトコンベヤ上に置き、物質を残して溶液中の溶媒を蒸発させ、次いでベルトを、質量分析計に付随しているイオン化室の真空雰囲気中まで動かす、そこで物質がイオン、電子あるいはレーザから来る光量子の形の高度に濃縮されたエネルギーに曝露される。特許権者は、開示された種々の具体例に共通の主要な概念は、コンベヤベルト上の試料の高度に集中されたエネルギーへの曝露を、常に非常に短い間隔、即ち数分の一秒以内に限ることを要求しており、エネルギーの集中によって試料分子間の結合が、分子の化学分解を生じることなしに、あるいはそれに先立つて局部的に分離する様になされるようにしたと述べている。

スツーク (Stuke) の米国特許第 4,686,366 号は、パルス・レーザビームが質量分析計内で分析されるべき分子をイオン化するレーザ質量分析計を開示している。レーザ・パルスの持続時間は、分析される分子の分裂を避けるため、数ピコ秒に限られている。

これらの特許は、いずれも分子の不所望な分裂を回避することを意図した方法を記述しているが、現実の実施にあたつてかのような技術は部分的にしか成功していない、つまり分析される特定の分子（单または複数）にもよるが、ある分子は制御不能に分裂、あるいはクラスタし、そしてかような方法は予測不能で、それゆえ信頼できないと考えられている。

ポンバードされ、質量分析用のイオンを直接生み出す。FAB 技術の主要な潜在的利点の一つは、表面への試料分子の連続的供給にある。しかしながら、表面への凝結／偏析を避ける分子の型、表面における分裂分子の蓄積、溶媒分子からの干渉、ならびに結果として生じる混合試料中の相対量を定量する困難性が欠点として含まれる。

試料溶液に関する他の質量分析的方法には、質量分析に先立つ気化およびイオン化のため溶液を直接スプレイする方法が含まれる。かようなスプレイ法の第一のもの、所謂サーキソスプレイ技術は、ベスター (M.L.Vestal) によりサイエンス (Science) Vol. 226, (1984), pp. 275-281 に掲載された「高性能液体クロマトグラフィー・質量分析」(High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) と題する論文に記述され、そこで、キャビラリーに充分な熱を加えて、溶液がキャビラリーを通過する際、溶液の制御された部分的な気化が生じるようにした、運行粒子あるいは滴を伴う超音波ジェットの生成と定義されている。

スプレイ法の第二のもの、所謂エレクトロスプレイ法は、ワングラ (Wong et al) によりジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー (Journal of Physical Chemistry) Vol. 92 (1988), pp. 546-550 に掲載された「ポリエチレン・グリコールのエレクトロスプレイ・イオン化におけるマルチブル・チャージング」("Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(ethylene glycols)") と題する論文に記述され、そこで、著者は、溶液を、接地電位のメタライズしたキャビラリー管に對し高い電圧で保たれた金属の注射針を通じてエレクトロスプレイ室内に導入する方法であると述べている。針先端の高い電場

ベッカーラ (Becker et al) の米国特許第 4,739,079 号は、本発明者らによつてなされ本発明の譲受人に譲渡され、かつここに相互参照がなされているが、イオンビーム、電子ビームあるいはレーザビームのようなプローブ・ビームが、分析される表面に対して向けられ、物質の試料がその表面から取り除かれるようにした試料の質量分析方法および装置を開示している。次いで、非同調の高強度レーザビームのような電磁放射のビームが、その表面の上の空間領域に向けられ、その放射ビームの中で、取り除かれた表面試料の非共鳴的な光イオン化を生じさせる。イオン化された試料は次いで、質量分析に供される。

過去約 10 年にわたつて、ブルーニーらの特許で述べられたような試料の粒子または光量子のポンバードを使用する大きな不揮発性または熱的に不安定な分子の質量分析を記述した文献の数多くの例が現れて來た。この開発を回顧した一論文は、ブッシュおよびクークス (K.L.Busch and R.G.Cooks) による「大きな壊れ易い不揮発性分子の質量分析」("Mass Spectrometry of Large, Fragile Molecules") と題し、サイエンス (Science) Vol. 218, (1982), pp. 247-254 に掲載されたものである。

この論文に記述された方法の一つは、高速原子ポンバードメント (FAB) と呼ばれる。この FAB 法は、ライネハート (R.L.Rinehart, Jr.) によりサイエンス (Science, Vol. 218, (1982), pp. 254-260) に掲載された「高速原子ポンバードメント質量分析」("Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry") と題する論文で、より詳しく回顧されている。FAB 法では、試料は低揮発性の、普通グリセロールである溶液中の溶液とされる。この溶液は、次いでキロ電子ボルトのエネルギーの原子により

が、出現する液体の表面を荷電し、それを荷電滴の微細なスプレイに分散させる。その滴がキャビラリー管に向かつて進むとき、溶液は、荷電した溶液を強して蒸発し、溶液は次いでキャビラリー管を通じて質量分析計まで進む。)

しかしながら、上記の場合の各々において、質量分析のための生体分子のような大きな不揮発性分子の調製は、分子を、分子のイオン化に先立ちあるいはイオン化中に気化させようと試みながらも、依然として大きな分子の非特徴的分裂またはクラスタリング、あるいは大きな分子のその他の特徴付けられない、または信頼出来ない単離の危険を招くものである。

#### 発明の概要

それゆえ、本発明の一目的は、分子の不所望な分裂の危険を最小限にする手法での、1 以上の型の大なる分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のこの他の目的は、分子の非特徴的な分裂、あるいは分子の不明瞭で信頼不能な同定を招く危険を最小限にする手法での、大きな分子の質量分析用純粋または混合試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を溶液中に、あるいは既に存在している適当な溶液を使用して溶解し、統いて得られた溶液を凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子を脱着することによる、後続のイオン化のために信頼し得る一様な手法での、1 以上の型の大なる分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、分析すべき大きな分子を溶液中に溶解し、得られた溶液を約 10<sup>-4</sup> ルを越えない蒸気圧を与

#### 特表平3-503317(4)

れる温度で凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を溶媒中に溶解し、得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液を約10<sup>-3</sup>トルを越えない蒸気圧を与える温度まで冷却し、次いで、脱着工程中の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をレーザ放射、イオンビーム・ポンバードメントあるいは高速原子ビーム・ポンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、分析すべき大きな分子を、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒中に溶解し、得られた溶液を約10<sup>-3</sup>トルを越えない蒸気圧を与える温度で凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をレーザ放射、電子ビーム・ポンバードメント、イオンビーム・ポンバードメントあるいは高速原子ビーム・ポンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒中に溶解し、得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液を約10<sup>-3</sup>トルを越えない蒸気圧を与える温度まで冷却し、次いで、脱着工程中の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結試

料の表面から大きな分子をレーザ放射、イオンビーム・ポンバードメントあるいは高速原子ビーム・ポンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させ、次いで、脱着分子をイオン化エネルギー源に曝露して、イオン化分子の質量分析の準備をするよう、脱着分子をイオン化することによる、1以上の大分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のこれらおよびその他の目的は、以下の説明および添付図面から明らかとなるであろう。

##### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明方法を概略的に描いたフロー・シート、

第2図は、本発明方法の実施に関する有用な装置を説明する一部を切り開いた斜視図、また

第3図は、凍結溶液を大きな分子の真空室内での脱着を許容するのに充分な低温に維持するのに使用される冷却手段を示す第2図の一部の分解側断面図である。

##### 発明の詳細な説明

本発明によれば、大きな分子は、最初に、その後かような大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを吸収することの出来る低分子量の溶媒中の大きな分子の溶媒とし、次いで得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液をレーザ、電子ビーム、イオンビームあるいは高速原子ビームのような脱着エネルギー源に曝露して、かような大きな分子を凍結溶液の表面から脱着させることにより、その大きな分子の不希望な分裂の危険を最小限にしながら、質量分析で分析することが出来る。

若し、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギー源が同時に分子をイオン化しないならば、脱着分子を、別の、例えばレーザビームの光イオン化源のようなエネルギー源に曝

露して、質量分析装置での分子の分析に先立つて脱着分子をイオン化させてもよい。いずれの場合でも、脱着工程中の分裂は避けられるか最小限に食い止められ、非特定の、あるいは制御不能な分裂は起こらないようになる。

若し、分子（单または複数）に官能基があり、それが存在すれば、そこで開裂が起こる特定の点での開裂による、そうした官能基の分析を通じての分子（单または複数）の同定のための追加的手段を提供するため、大きな分子あるいは分子の混合物を分裂させることができましいならば、かような分裂崩壊は、かような分裂に使用されるエネルギーが非特定の分裂を避けるべく、および／または、その中で分子の官能基（複数）が脱接していると言ふ洞察のため分裂の程度をゆっくり変化させるべく注意深く制御することが出来る別の工程でてもよい。かような後続の別の分裂工程は、当技術に熟達した者に良く知られており、本発明の一部を成すものではない。

凍結溶液を形成し、次いでこの溶液の表面から分子を局部的にのみ脱着させること、即ち、好ましくは、分子の質量にもよるが一時に約1から100層の分子、即ち一時に約300オンストロームの深さまで脱着させることにより、そうでなければ、分子の内いくらかのものの分裂または反応を招く大量の活性エネルギーに対する、分子の暴露を最小限にしながら、大きな分子の制御された活性を与えることが可能となる。

「大きな分子」なる用語の使用により、それに、バイオモレキュール、即ち少なくとも500原子質量単位(aau)の分子量を有する生命化学分子、のような分子を意味させる。脱着工程中のかような大きな分子の分裂の危険を最小限にしながら、本発明方法で有利に処理可能なバイオモレキュールあるいは生命

化学分子のような大きな分子の例には、ペプチドおよび多糖類が含まれる。

この大きな分子は、好ましくは、脱着エネルギー源からのエネルギーを強力に吸収する低分子量溶媒、例えばレーザの波長でのレーザ光を強力に吸収する低分子量の溶媒中に溶解させられ、凍結試料の大部分には脱着エネルギーは僅かにのみ浸透して、上で議論したように凍結溶液から、分子の表面の頂上層あるいは頂上のいくらかが、即ち表面の約1—100層に限つて除去されることが容易なようになる。

「低分子量の溶媒」とは、約100 aauより小さい原子量を有する分子より本質的に成る1以上の化合物を含む溶媒を意味する。本発明の実施に使用可能な溶媒の例には、水、アルコール、アルデヒド、ケトンおよび有機酸のような1—5の炭素の有機溶媒およびかような有機溶媒のハロゲン化誘導体が含まれる。かような溶媒を使用する理由には、容易な溶解、より豊富な脱着溶媒分子の流れにおいて、より大きな溶媒和した分子を運行すること、より軽く、より速く運動する溶媒分子との多くの衝突による大きな分子の内部的な自由度を冷却すること、衝突の連鎖間ににおける急速なエネルギー消散、および溶媒と溶質分子との間の質量の大きな差による質量干渉の回避が含まれる。

好ましい実施例に従つた、脱着源からのエネルギーの溶媒による吸収の度合いに関して、「強力に吸収する」なる用語は、脱着源、とりわけ脱着エネルギー源がレーザ源であるとき、それからのエネルギーを充分に吸収し、約70—100%のエネルギーを凍結溶液の表面の約1—10マイクロメータ以内で吸収するような溶媒を意味する。これは、脱着工程において、若し

### 特表平3-503317(5)

、凍結溶液の質量全体が刺激されているとすれば、より容易に起き得る大きな分子の分裂を阻止しながら、大きな分子の所望の制御された脱着を与える。それにより、試料の不必要的加熱が避けられ、そして脱着を分子層の極く限られた範囲に限定することにより、脱着を、より制御され一様なもの、即ち溶質分子とは無関係なものとすることができます。

溶媒中の大きな分子の濃度は、充分に低くして、溶質分子の重要な相互作用を避け、刺激ビーム—溶媒の相互作用が脱着プロセス全体を支配することを許容し、このプロセスが信頼でき一様であるよう、即ち溶質分子の性質に強くは依存しないようすべきである。したがつて、溶液の濃度は、 $10^3$  溶媒分子につき約 1 を越えない溶質分子のものとすべきであり、典型的には、濃度は、 $10^4$  溶媒分子につき約 1 を越えない溶質分子のものとなる。

本発明にしたがつて低分子量の溶媒に溶けた大きな分子の溶液を作つた後、溶液は、そこから分析すべき大きな分子が脱着しうる固体物質を与えるために凍結される。

分析すべき凍結溶液試料を作るために凍結される溶液の量は、大きい必要はなく、より大きい量も許容しうるが、一滴、例えば最小約 1 ルリの小量で構成されてよい。

続く脱着工程自体のために、溶液の温度を、液体溶液を固相に変えるのに充分なように低くすることだけは必要である。しかしながら、大きな分子は脱着の後、脱着が真空室で起こることを指令する高真空の質量分析装置に運ばなければならない。

この点から、凍結溶液を、脱着に先立つて、そこでの蒸気圧が凍結溶液を脱着工程前に真空室に入れることを許容するような充分低い温度まで冷却することが必要である。好ましくは、

凍結溶液は、そこで凍結溶液の蒸気圧が、約  $10^{-1}$  トルを超えない温度、さらに好ましくは、約  $10^{-7}$  トルを超えない温度まで冷却すべきである。

この冷却は、凍結溶液を脱着工程が生じる真空室に入れる前に行なつてよく、効果的である。しかしながら、凍結溶液を真空室に入れた後、その温度をさらに冷却することも本発明の範囲内である。

いずれの場合でも、凍結溶液を真空室の所望の低い圧力を維持するのに充分な低い温度に維持するため、ならびに溶媒の優先的な蒸発に由来する試料の頂部における一様でない濃度分布を避けるため、真空室内に冷却手段を設けることが必要である。これは、装置の説明で後述するように、その上に凍結溶液が乗り、それを通じて外部の冷却源からの冷媒が循環する真空室のコールド・プレートを含むものであつてよい。

第2図および第3図を参照すると、本発明の実施に使用するのに適した装置が概略的に示されている。この装置のいくつかの局面は、そうしたもののが詳細構成に関して、相互参照した上述の、ベッカーらの米国特許第 4,733,073 号に図解し記述された装置とほぼ同様である。

第2図に示すように、真空室 2 内には、試料保持具 10 が設けられており、その上に凍結溶液の試料 8 が置かれあるいは乗せられている。真空室 2 内には、さらに慣用の真空ポンプ手段（図示せず）に導くポート 6 を含む室 2 のための排気手段が設けられている。

第3図でより詳細に示すように、試料保持具 10 は、さらに試料 8 を、少なくとも  $10^{-3}$  トルを超えない温度、好ましくは、約  $10^{-7}$  トルを超えない所望の低い蒸気圧を維持するのに充

分な冷却温度に維持する手段 12 を含むものであつてよい。冷却手段 12 は、それを通じて外部の冷却源 22 からの冷媒が流入管 18 および流出管 20 を経由し循環する 1 以上の通路 16 を有する金属バック・プレート 14 を含むものであつてよい。

脱着エネルギー源手段 30 は、真空室 2 の外部あるいは内部（図示のように）のいずれに置かれてもよいが、脱着エネルギー源 31 および指向手段 32 を含むものである。源 31 には、電子銃、イオン銃あるいはレーザが含まれてよい。キロ電子ボルト・エネルギーの中性原子あるいは分子もまた、脱着エネルギー源 31 として使用することができる。かようなエネルギー源の構造は、慣用のもので、当技術に熟達した者に、例えば電子ビーム脱着、イオン・ビーム・スペックティングあるいはレーザ・マイクロプローブ技術からよく知られているものである。

脱着エネルギー源 31 と結合してエネルギー源 31 からのエネルギー・ビームを試料 8 上に指向する指向手段 32 は、荷電粒子ビームに対する静電および/または電磁集束および偏向手段、あるいは試料 8 の表面上にレーザ光ビームを指向・集束させる鏡およびレンズを含むものであつてよい。

直接イオン化、即ち脱着と同時のイオン化、が適しない場合について、真空室 2 内の脱着分子をイオン化するため、イオン化手段 40 もまた備えられている。イオン化手段 40 は、イオン化ビームの位置を決定するのに使用する高強度光源 42、集束レンズ系 44 およびアイリス絞り 46 を含むものであつてよい。イオン化ビーム源 42 は、典型的には、高強度レーザあるいは分析すべき脱着した大きな分子の効果的な光イオン化を充分に達成するために共に結合したレーザと光学材料および部品との組合せによって装備される。

第2図に示す実施例において、真空室 2 には、そこを通じて放送のイオン化ビームが投射される直徑方向で対向している窓 52 および 54 が備えられていてよい。この実施例では、イオン化ビーム源 42 が、真空室 2 の外側に設けられ、イオン化ビームは窓 52 を通じて分析すべき試料 8 の表面に近接したイオン化領域に向けられる。イオン化ビームは、続いて窓 54 を通じて位置決定アイリス絞り 48 を過ぎ、イオノ化ビーム源 42 の光強度を監視する役割の検出器 50 に受け止められる。

イオン化ビーム源 42 は、非共鳴マルチ光量子イオン化について、 $10^4$  から  $10^{12}$  W/cm<sup>2</sup> の範囲のパワー密度を有するレーザを含むものであつてよい。このレーザは、タイム・オブ・ライト質量分析のために、約  $10^{-9}$  秒またはそれ以下の周期のパルスで、パルス駆動されるものであつてもよい。非共鳴シングル光量子イオン化に対しては、より小さい光強度が要求される：しかし一般的に、パルス当たり少なくとも約  $10^{11}$  個の光量子を有するパルスが効果的なイオン化のために必要とされる。

脱着時にイオン化しない脱着分子のイオン化は、真空紫外線（VUV）放射を伴うシングル光量子イオン化を使用して行つてもよく、これは大きな分子に対する柔軟な方法で、非選択性であり、また極めて効果的したがつて高感度にことができる。非直線的に作られたコーヒーレントな光ビーム、例えば、118 ナノメータで約 10.5 電子ボルトのエネルギー・レベルを有するものは、シングル光量子 VUV 光イオン化源として便利である。シングル光量子ビーム源の強度は、マルチブル・イオン化が起こらないように制御しなければならない。光イオン化・ビーム源の強度は、それゆえ好ましくは吸収確率が、約 10% を越えない

特表平3-503317(6)

オノ化は、脱着される分子にもよるが、脱着工程と一緒に行つてもよく、また別のイオン化工程で行つてもよい。成る特徴的な崩壊が、質量分析のために望ましいときがあるので、本発明のシステムは、脱着された手法での意図的崩壊工程（例えばレーザ放電あるいは衝突活性化）の追加を容易にするのに役立つようにされている。このようにして、脱着、イオン化および、必要なら崩壊の3プロセスは、最大の効果のために最大限に断結合(decouple)されていてよい。

いように制御される。

マルチブル光量子は、若し特定の分析すべき大きな分子のイオン化ボテンシャルが、より短い波長即ち約130ナノメータより短い波長を使用しない限りシングル光量子エネルギーより高い時にも脱着分子をイオン化するのに使用してもよい。しかしながら、マルチブル光量子イオン化を使用した時、強度の制御はとりわけ重要となる、と言うのは、分子の制御不能な崩壊が生じる暴走(runaway)吸収条件を経験することがあるからである。一般的に、約 $10^1$  W/cm<sup>2</sup>を越えないレーザ・パワー密度が適当である。

しかしながら、シングルあるいはマルチブル光量子イオン化のいずれを使うかで、分析すべき大きな分子のイオン化に必要とされるエネルギーを越えるある追加的なエネルギーの吸収が、大きな分子に付着しているすべての溶媒分子を振り払うのに使われてよい運動エネルギーに変換されることがあり、また追加的に吸収されたエネルギーが、単に電子除去における動力学的エネルギーとして消散すると言ふことに注意しなければならない。

真空室2はさらに、第2図で一般的に60で示す本発明による凍結溶液から脱着し、イオン化した大きな分子の質量分析のための質量分析手段を含んで（あるいは、それと結合して）いてよい。この質量分析手段60の代替的な型は、ここに相互参照した上述の、ベッカーラの米国特許第4,733,073号で、より詳細に議論されている。

かようには、本発明は、凍結溶液からの脱着が、脱着工程中、大きな分子の分裂あるいはクラスタリングを最小限に止める手法での質量分析のための大きな分子の処理方法を提供する。イ

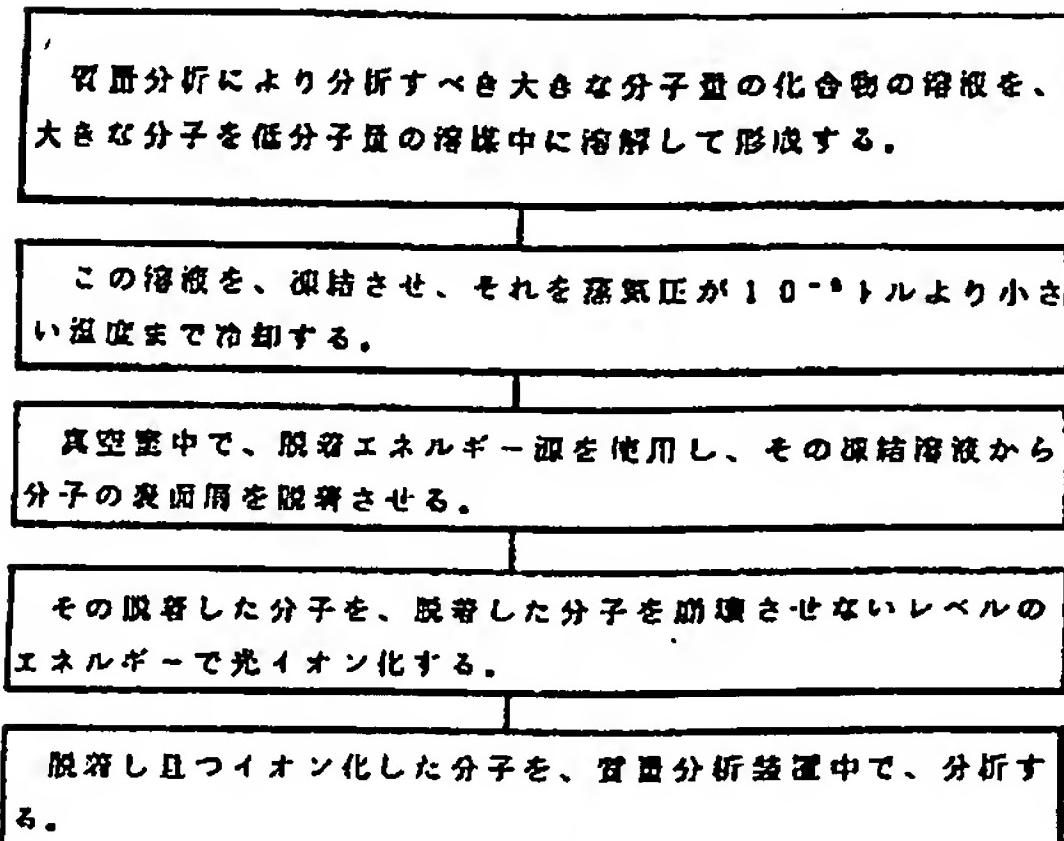


FIG. 1

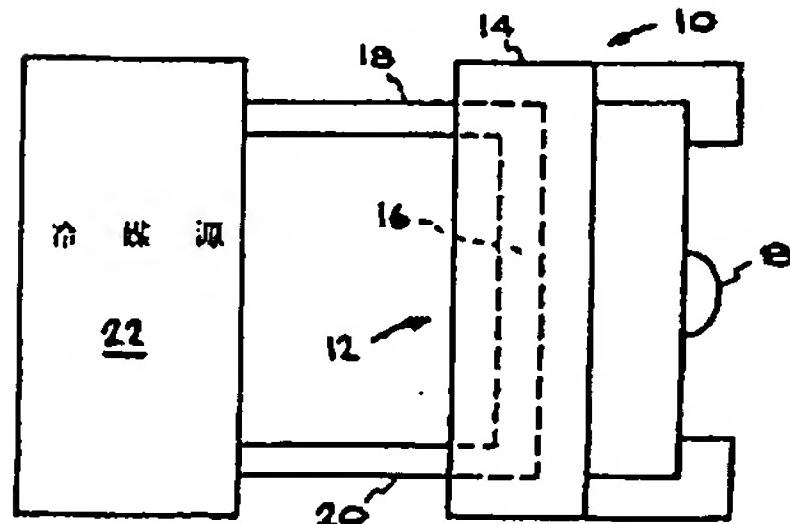


FIG. 3

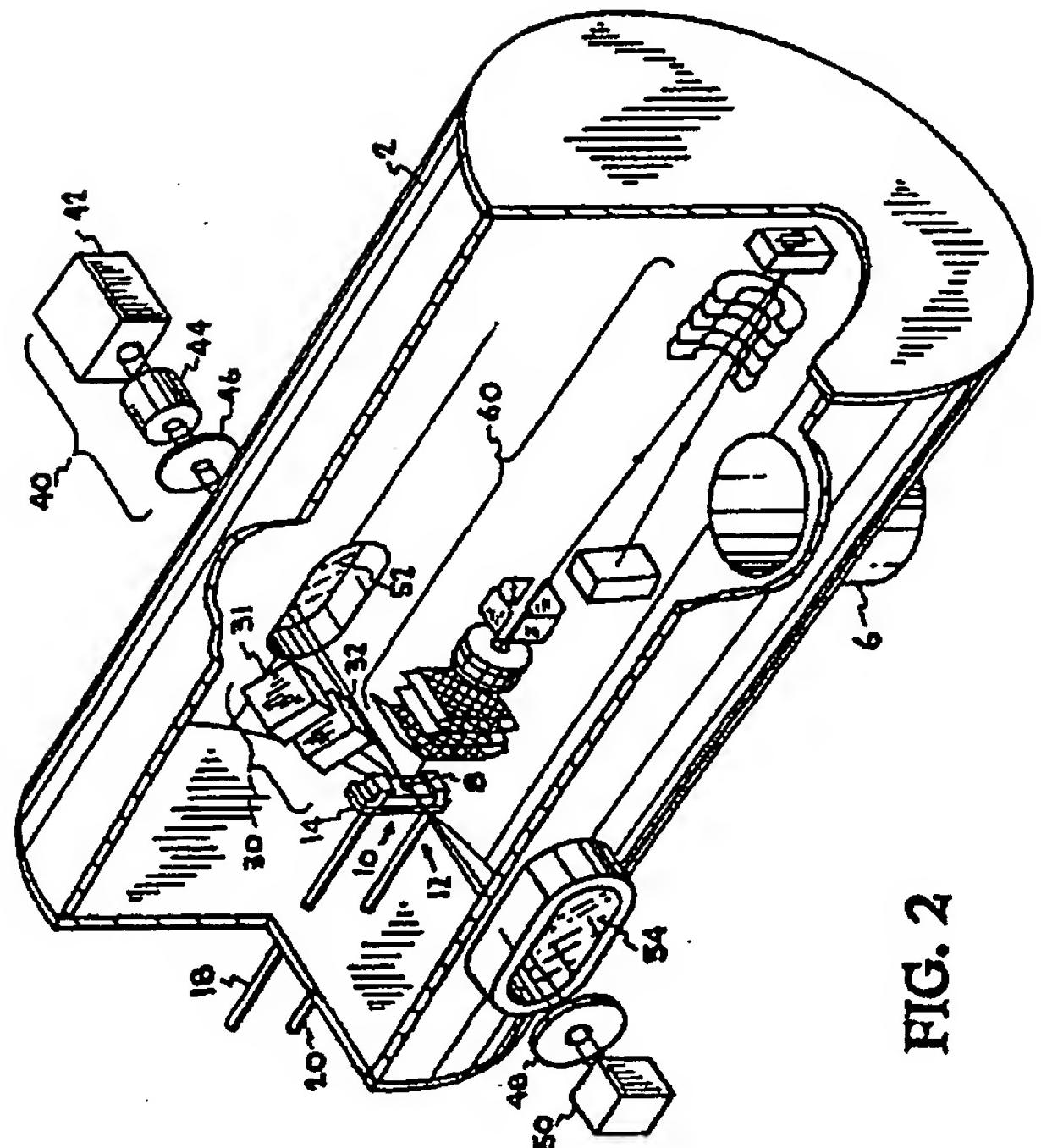


FIG. 2

国際調査報告

International Application No. PCT/US 90/00229

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (or several classification numbers may be used)			
Arranging Classification Patent Classification (IPC) or its local National Classification and IPC			
IPC <sup>5</sup> H 01 J 49/04, G 01 N 30/84			
II. FILES SEARCHED			
Information Documentation Searched:			
Classification System I Classification System			
IPC <sup>5</sup> H 01 J, G 01 N, H 01 L			
Documentation Searched other than that set out in Documentation to the extent that such documents are included in the files searched.			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category <sup>11</sup> Cited in Document, M-odd number, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup> (Refer to Claims No. 11)			
A	WO, A, 85/02907 (SRI INTERNATIONAL) 4 July 1985 see figure 1; page 6, lines 8-20; page 9, line 35 - page 10, line 2; page 13, lines 17-34; page 15, lines 18-24 (cited in the application)	1-3, 9-20	
A	EP, A, 0175467 (NICOLET INSTRUMENT CORP.) 26 March 1986 see figure 1; abstract; page 9, lines 15-25; page 10, lines 21-27; page 11, lines 8-12	1-3, 10, 15, 20	-----
A	US, A, 4663944 (M.T. BERNIUS et al.) 12 May 1987 see figure 3; abstract	1, 15, 20	
-- . / .			
<small><sup>11</sup> Source of cited documents:            *A document indicating the patent rights of the art which is not            considered to be of particular relevance            *B early document but submitted on or after the international filing date            *C document which has been submitted prior to the international filing date of another            invention or patent application (as so modified)            *D document referring to one or more documents, not publication or            patent family            *E document published prior to the international filing date but            later than the priority date or claimed</small>			
<small><sup>12</sup> Information submitted other than the international filing date            or priority date and not in conflict with the application but            used to understand the principle or theory underlying the            invention            *F document of particular relevance; the claimed invention            cannot be considered prior or based on compared to            inventors prior art            *G document of particular relevance; the claimed invention            cannot be considered prior or based on compared to            inventors prior art            *H document or comparison to one or more other basic documents            which are considered basic patents in the same field            *I published member of the same patent family</small>			
IV. CERTIFICATION			
Date of the latest Completion of the International Search 10th May 1990	Date of mailing of the International Search Report 26.06.90		
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of International Officer M. PEIS		

Form PCT ISA-91/0107 (Rev. 01/90) (English version)

International Application No. PCT/US 90/00229 2

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)			
Category <sup>11</sup> Citation of Document was made in order to support or to improve passage <sup>12</sup> Document to Cite No.			
A	Science, vol. 218, 15 October 1982, AAAS, K.I. Busch et al.: "Mass spectrometry of large, fragile, and involatile molecules", see pages 247-254 (cited in the application)		
A	Measures Régulation Automatisme, vol. 48, no. 2, 21 February 1983, (Paris, FR), M.O. Miziar: "Le récent couplage CPL/SM doit reculer les limites de l'analyse", see pages 51-61		

Form PCT ISA-91/0107 (Rev. 01/90) (English version)

国際調査報告

US 9000229  
SA 34354

This annex lists the patent family members relating to the subject documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EPO file on 12/06/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A- 8502907	04-07-85	AU-B- 570531 AU-A- 3744785 CA-A- 1220879 DE-T- 3490595 EP-A, B 0167561 GB-A, B 2160014 JP-T- 61500866 NL-T- 8420306 SE-B- 452676 SE-A- 8503901 US-A- 4733073	17-03-88 12-07-85 21-04-87 28-11-85 15-01-86 11-12-85 01-05-86 01-11-85 07-12-87 21-08-85 22-03-88
EP-A- 0175467	26-03-86	US-A- 4594506 JP-A- 61071353	10-05-86 12-04-86
US-A- 4663944	12-05-87	None	

For more details about this annex, see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/03